

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**ELUCIDAÇÃO DOS COMPONENTES E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA E ANTIFÚNGICA DO ÓLEO  
DA SEMENTE DE *ACANTHOSYRIS SPINESCENS***

**BETINA DAUBER**

**Porto Alegre, dezembro de 2016.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**ELUCIDAÇÃO DOS COMPONENTES E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA E ANTIFÚNGICA DO ÓLEO  
DA SEMENTE DE *ACANTHOSYRIS SPINESCENS***

**BETINA DAUBER**

**Orientadora: Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser**

**Co-orientadora: Profa. Dr. Miriam Anders Apel**

**Porto Alegre, dezembro de 2016.**

## **Nunca Desistir**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela família maravilhosa que me deu, pelas oportunidades e por poder concluir esta graduação e este trabalho.

Agradeço a minha orientadora, a Gil, por ter me recebido muito bem no laboratório de Farmacognosia nos primeiros semestres da faculdade e desde então por tudo que me ensinou, pela paciência e pela dedicação, tanto na iniciação científica, como no desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso. Também agradeço a minha co-orientadora, Miriam, pela dedicação e pela ajuda nos experimentos do trabalho.

Aos meus amigos, nas tantas vezes que me ausentei nos eventos, ou que saí mais cedo, pois precisava fazer o TCC ou estudar.

Agradeço a vó Loiva, por todas as orações para que tudo desse certo na faculdade, no estágio e no TCC e ao vô Ré, por todo apoio moral, pelas orações e as perguntas de “quando tu voltará pra casa?”.

A dinda Mara por ter se tornado “minha segunda mãe” nesses últimos anos e ter feito jus a isso, me acompanhando e vivendo todas as minhas alegrias e tristezas, por ter cuidado de mim, por cada chá com mel e limão, pela parceria, pelas conversas, por ter sido muito mais que uma tia!

A minha irmã, Bianca, por toda paciência com meus estresses, pelo companheirismo, pelas conversas e pela cumplicidade.

Aos meus pais, Roberto e Magda, agradeço pelo amor, carinho e dedicação, por terem proporcionado que todos os meus sonhos se tornassem realidade, sem medir esforços e sempre me mostrando o melhor caminho. Pelos valores que me passaram, pela educação que me deram e tudo que vivem comigo, por sempre me acompanharem, me guiarem e, mesmo longe nos últimos meses, estarem presentes em todos os momentos da minha vida, muito obrigada!

A minha mãe, por todas as cobranças e observações na elaboração deste trabalho, com as incansáveis leituras, buscas por artigos, correções e incentivo.

A todos que participaram deste trabalho, direta ou indiretamente, obrigada pela ajuda e compreensão.

## RESUMO

A indústria farmacêutica tem investido em estudos de plantas medicinais como medicamentos, pois se estima que 80% da população mundial confia no tratamento médico com derivados de plantas. Entre as plantas estudadas estão as da família Santalaceae, que apresentaram no óleo de suas sementes ácido graxos não usuais com ligações triplas, o que é considerado um mecanismo de defesa contra patógenos. Uma das espécies da família Santalaceae é *Acanthosyris spinescens*, uma planta frequente na região sul do Brasil, mas pouco estudada até agora. O objetivo desse estudo foi elucidar os componentes do óleo da semente de *A. spinescens* e testar sua atividade antiquimiotóxica e antifúngica. Foi realizada a extração do óleo da semente e sua derivatização para análise em cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. A partir dos cromatogramas foi identificada a presença de ácidos graxos acetilênicos. Após, foi testada a atividade antiquimiotóxica pelo método da câmara de Boyden com leucócitos tratados com o óleo de *A. spinescens* e a atividade antifúngica pela concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de *candida* e fungos filamentosos. Para a atividade antiquimiotóxica houve inibição da migração leucocitária na concentração de 0,01 µg/mL e para antifúngica os resultados foram negativos. Assim, acredita-se que nenhum dos ácidos graxos acetilênicos encontrados no óleo da semente de *A. spinescens* seja responsável por essas atividades, e sim outro ácido graxo presente nas outras plantas da família Santalaceae.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Material vegetal.....	11
3.2 Extração.....	11
3.3 Derivatização.....	13
3.4 Análise por cromatografia gasosa.....	13
3.5 Atividade antiquimiotóxica.....	14
3.6 Atividade antifúngica.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Extração.....	15
4.1.1 Extração I.....	15
4.1.2 Extração II.....	16
4.2 Análise por cromatografia gasosa.....	16
4.3 Atividade antiquimiotóxica.....	22
4.4 Atividade antifúngica.....	24
5. CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças é uma das práticas mais antigas do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, confiam em medicamentos derivados de plantas como forma de tratamento médico (Maroyi, 2016). Assim, o interesse por tratamentos com plantas medicinais tem crescido nos últimos anos, sendo maior o investimento da indústria farmacêutica na utilização de produtos naturais como matéria-prima, tornando-se necessárias mais pesquisas por esses produtos e suas aplicações farmacológicas.

Os recentes avanços e o desenvolvimento de novas técnicas de identificação e avaliação farmacológica têm comprovado o potencial terapêutico de metabólitos vegetais comuns a várias plantas. Exemplo disso é o emprego consolidado de vários compostos isolados de plantas, obtidos a partir de matéria-prima vegetal ou de síntese e semi-síntese de estruturas precursoras produzidas por elas. Entre estes, pode-se citar a digoxina, derivada de *Digitalis* spp., a morfina e a codeína de *Papaver somniferum* e o paclitaxel de *Taxus brevifolia* e *Taxus bacata* (Rates, 2001).

Entre as plantas utilizadas na terapêutica estão as da família Santalaceae, que consiste em aproximadamente 40 gêneros e 400 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do mundo (Hou *et al.*, 2013). Os membros dessa família exibem uma grande variedade de forma e estrutura. A variação da estrutura floral, a natureza do ovário, a redução do gineceu e o alongamento do saco embrionário além do óvulo são algumas das características notáveis que atraíram atenção dos morfologistas e embriologistas (Raj, 1972). Essa família abriga espécies parasitárias de outras plantas, assim sofrem redução ou perda das características morfológicas e fisiológicas. Os compostos majoritários encontrados previamente em plantas da família Santalaceae foram óleos fixos e essenciais, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides e fenóis.

Muitas plantas são usadas na terapêutica, mas há aquelas que ainda não foram estudadas ou não tiveram atividade comprovada. Como exemplo podemos citar *Acanthosyris spinescens*, uma espécie que ocorre com frequência no Rio Grande do Sul, que pode apresentar potencial alimentício (Kinupp e Lorenzi, 2014). Além disso, segundo estudos prévios, o óleo de suas sementes pode ter atividade contra patógenos (Okada *et al.*, 2013).

Algumas plantas apresentam óleos fixos, como a *A. spinescens*, outras óleos voláteis. Os óleos fixos, importantes para a indústria alimentícia e farmacêutica, são extraídos de plantas e sua principal função é armazenar nutrientes para as mesmas. Eles são constituídos principalmente por triacilgliceróis e diferem da gordura apenas pelo ponto de fusão (Salgado *et al.*, 2007), pois em temperatura ambiente são líquidos.

Estudos da década de 60 revelaram aproximadamente 20 ácidos graxos com ligações conjugadas no óleo de sementes. Esses ácidos graxos conjugados foram identificados no óleo das sementes de 11 famílias de plantas, todas caracterizadas como dicotiledôneas (Hopkins e Chisholm, 1968). Um exemplo são as plantas da família Santalaceae, que acumulam ácido ximênico (ácido trans-11-octadecen-9-inoico, ácido santálbico) no óleo de suas sementes (Okada *et al.*, 2013), que foi observado pela primeira vez no óleo de *Ximenia caffra* (Olacaceae), e depois na família Santalaceae (Hopkins e Chisholm, 1968). Além de estar presente no óleo das sementes, o ácido ximênico também pode ocorrer em cascas, raízes, caules ou galhos das plantas. Esse ácido graxo não usual pode ser tóxico para humanos, mas como o ácido santálbico contém um interessante grupamento conjugado ene-ine, pode ser interessante para a indústria química (Aitzetmüller., 2012).

A produção de ácidos graxos não usuais com ligações triplas é considerada um mecanismo de defesa contra patógenos (Okada *et al.*, 2013), então esses ácidos graxos não usuais têm sido investigados como agentes anti-inflamatórios (inibidores competitivos da cicloxigenase) (Aitzetmüller, 2012) e antifúngicos (Maroyi, 2016). Além da família Santalaceae, esses ácidos graxos não usuais também foram descritos nas famílias Olacaceae e Opiliaceae. Também foram reportados no óleo dessas sementes ácido oleico e pequenas



quantidades de ácido linoleico, linolênico e estearóico (ácido 9-octadecinoico) (Okada *et al.*, 2013). O óleo de *Pyrularia pubera*, examinado por Hopkins e Chisholm (1968), revelou o ácido pirúlico, que é um análogo do ácido ximênico com 17 carbonos, além de outros ácidos acetilênicos.

*Acanthosyris* Griseb é um dos gêneros da família Santalaceae, que é composto por seis espécies, que são *A. falcata* Griseb, *A. spinescens* Griseb, *A. glabrata* Griseb, *A. paulo-alvinii*, *A. asipapote* e *A. annonagustata* (Kinupp e Lorenzi, 2014). No Brasil há registro de duas espécies: *A. paulo-alvinii* na Bahia e *A. spinescens* no Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, além de Argentina e Uruguai.

*Acanthosyris spinescens*, uma planta nativa da região sul do Brasil, apresenta porte médio e popularmente é conhecida como sombra-de-touro (Kinupp e Lorenzi, 2014). A formação dos botões florais ocorre a partir de setembro, a floração entre outubro e novembro e a maturação dos frutos ocorre de janeiro a maio, com o pico no início do mês de fevereiro. O fruto mede em torno de 1,5 cm, é amarelo, carnoso, a polpa é branca e a semente marrom com uma amêndoa branca, sólida e oleosa. Na medicina popular o decoto (chá) das folhas é usado contra febres graves e, externamente, para lavar feridas e ulcerações (Kinupp e Lorenzi, 2014). Além disso, os frutos quando consumidos (vários) *in natura*, quentes ao sol (colhidos no pé), podem ter ação laxante considerável.

*Acanthosyris spinescens* foi pouco estudada, mas há alguns relatos da década de 1960 que revelaram no óleo da semente dessa espécie a presença de ácidos graxos não usuais, com uma concentração muito mais alta de ácidos graxos com 17 carbonos que as concentrações encontradas nas plantas pesquisadas anteriormente, como a *Pyrularia pubera* (Powell e Smith Jr., 1966). Os espectros de infravermelho e ultravioleta indicaram a presença de hidroxil, acetileno, metileno terminal, grupos ene-ine conjugados (Powell e Smith Jr., 1966) e de ácidos hidroxiacetilênicos, que tendem a ocorrer em proporções maiores nas espécies que têm ácidos acetilênicos (Hopkins e Chisholm, 1968). Considerando as propriedades já descritas até aqui, como a possível atividade antiquimiotóxica e antifúngica, a investigação do óleo de

*Acanthosyris spinescens* poderá trazer resultados significantes para a indústria farmacêutica, química e alimentícia.

A inflamação, uma reação do organismo frente a uma agressão, apresenta cinco sinais, que são calor, rubor, tumor, dor e perda da função. Esses sinais refletem as mudanças hemodinâmicas e celulares que ocorrem durante o processo (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular) (Piornedo, 2010), que são reguladas pela liberação de mediadores pró-inflamatórios secretados pelos macrófagos na resposta inflamatória (Montserrat *et al.*, 2014) ; (Hwang *et al.*, 2013). Os mediadores dessa atividade são óxido nítrico (NO), eicosanoides, citocinas inflamatórias, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos.

As cicloxigenases (COX) têm um importante papel na modulação de condições fisiopatológicas, como a inflamação. Existem duas isoformas da COX, a COX-1, que mantém as funções fisiológicas normais da célula e a COX-2, que é expressa após uma série de estímulos, como as citocinas durante a resposta inflamatória (Mezayen *et al.*, 2006). A ativação dos macrófagos conduz à estimulação da COX-2 com aumento da produção de eicosanoides (Montserrat *et al.*, 2014) e de prostaglandinas, potentes mediadores pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico pelo metabolismo das COX (Mezayen *et al.*, 2006). O ácido araquidônico é o principal substrato para a COX e para a lipoxigenase (LOX), enzimas que aumentam a taxa de formação de fatores pró-inflamatórios (Guipu *et al.*, 2013). Essa substância é liberada a partir dos fosfolipídios pela ação da fosfolipase A2, que pode ter um importante papel no início e na amplificação da resposta inflamatória, providenciando substrato para a biossíntese de eicosanoides pró-inflamatórios. Diferentes isoformas de fosfolipase A2 são expressas e liberadas por neutrófilos, basófilos, células T, monócitos, mastócitos e macrófagos (Montserrat *et al.*, 2014) que promovem a produção dos mediadores pró-inflamatórios.

Estudos prévios demonstraram que ácidos acetilênicos com ligações triplas isolados de *Pentagonia gigantifolia* (Rubiaceae) apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente a

*Candida albicans* (Xing-Cong *et al.*, 2008). Assim como alguns ácidos graxos polinsaturados, como o estearidônico e o eicosapentanóico, causam inibição da produção de biofilme e da atividade metabólica de *Candida albicans* e de *Candida dubliniensis*. Quando comparados aos ácidos graxos saturados, aqueles com ligações duplas e triplas são, geralmente, mais potentes contra fungos patogênicos (Xing-Cong *et al.*, 2008). Os ácidos graxos são incorporados à membrana fosfolipídica, mas a interação destes varia conforme o peso e a saturação dos ácidos. Essas variações que dão aos ácidos graxos características distintas na sua ação antifúngica (Thibane *et al.*, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

Como há poucos estudos científicos sobre *A. spinescens*, esse estudo visa avaliar a composição do óleo fixo presente nas sementes dos frutos desta espécie e testar a atividade antiquimiotáxica e antifúngica, considerando os estudos prévios sobre ácidos graxos acetilênicos e seu potencial contra agentes patogênicos.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Material vegetal**

Os frutos de *A. spinescens* foram coletados em janeiro de 2016, mês em que ocorre a maturação dos frutos, no Jardim Botânico de Porto Alegre, pelo botânico Dr. Sérgio A. L. Bordignon (UNILASSALE, Canoas, RS).

### **3.2. Extração**

Foram realizadas duas extrações com técnicas diferentes para observar o rendimento de cada uma.

Na primeira extração (extração I) foram selecionados cinco frutos e estes foram descascados. As cascas e as polpas foram colocadas em um béquer e as sementes foram abertas e separadas das amêndoas (parte interna da semente), que foram distinguidas em grupo A e grupo B (estavam com aparência oxidada). Os frutos foram pesados, os do grupo A totalizaram 2,4948 g e os do grupo B 1,8532 g.

Para extração do óleo, as amêndoas do grupo A foram transferidas para um gral e trituradas com auxílio de um pistilo, foram realizadas três lavagens com hexano e transferido para um béquer, que ficou *overnight* na capela para evaporação do solvente. O mesmo procedimento foi realizado com as amêndoas do grupo B, aquelas que aparentavam estar oxidadas. Após a evaporação do solvente, observou-se que o óleo apresentava aspecto leitoso. Os béqueres foram então pesados novamente para o cálculo do rendimento e o material foi transferido para tubo de ensaio tarado, para que fosse visível a separação do óleo do conteúdo leitoso. O óleo dos grupos A e B foi transferido para tubos de ensaio previamente pesados e totalizaram 0,7169 g de óleo o grupo A e 0,2211 g o grupo B. Após a separação do óleo do conteúdo leitoso, o óleo foi derivatizado e injetado no cromatógrafo gasoso (CG).

Para a segunda extração (extração II) do óleo foram selecionados seis frutos, que tiveram suas amêndoas separadas conforme descrito no processo anterior. Novamente foram divididas em grupo A (2,4573 g) e grupo B (2,0640 g). As amêndoas A foram trituradas em gral com auxílio de pistilo e lavadas com hexano. O óleo foi transferido para um tubo de ensaio para centrifugação durante 4 min a 3000 rpm. O óleo de interesse ficou separado do conteúdo leitoso, então esse óleo foi transferido para um béquer previamente tarado. Com um secador de cabelos convencional foi evaporado o hexano e o óleo foi derivatizado (mesma técnica utilizada anteriormente) para posterior injeção no CG, nas mesmas condições utilizadas após a extração I.

### **3.3. Derivatização**

Para análise de óleos fixos por Cromatografia a Gás (CG), é necessário derivatização da amostra. Para tanto utilizou-se a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2010) (Composição de ácidos graxos por cromatografia a gás (5.2.29.15.4)) modificada. A amostra foi pesada em um erlenmeyer, ao qual foi adicionado metanol anidro e solução metanólica de hidróxido de potássio 60 g/dL. O erlenmeyer foi levado à chapa de aquecimento a 60 °C durante 15 minutos e depois foi arrefecido em água corrente. A amostra foi transferida para tubo de ensaio e o erlenmeyer lavado com hexano, que foi transferido para o mesmo tubo de ensaio. O tubo de ensaio foi agitado e adicionada solução de cloreto de sódio 200 g/L, foi agitado novamente e a fase orgânica foi recolhida em outro tubo de ensaio, ao qual foi adicionado sulfato de sódio anidro.

### **3.4. Análise por Cromatografia Gasosa**

A análise do óleo fixo foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG/EM), modelo Shimadzu QP5000, equipado com uma coluna capilar Fator Four, VF-23 (Varian, com 30 m x 0,25 mm e preenchida com um filme de 0,25 µm de espessura) para separação dos constituintes. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas a 260 °C, e a temperatura da coluna foi programada com rampa de aquecimento de 50 °C (mantida por 5 minutos), de 50 a 300 °C com variação de 3 °C/min, e mantida a 300 °C por 5 minutos, utilizando hélio como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 mL/min. Volume de injeção foi 1 µL com divisão de fluxo (Split 1:50).

Para a identificação das substâncias, após a cromatografia gasosa, a amostra passa por espectrometria de massas, que apresenta os fragmentos das respectivas substâncias e a biblioteca do equipamento adquirida pela NIST (National Institute of Standards and technology) indica quais os possíveis compostos presentes.

### 3.5. Atividade antiquimiotática

A avaliação da atividade antiquimiotática foi realizada de acordo com o método da câmara de Boyden modificado, descrito por Suyenaga e colaboradores (2011). Previamente ao ensaio, os leucócitos foram tratados com óleo de *A. spinescens* dissolvido em solução balanceada de Hank (HBSS pH 7,4), em concentrações de 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 µg/mL à 37°C por 30 min. Como controle negativo foi utilizada uma solução de neutrófilos sem adição de amostra. A solução de tratamento contendo os leucócitos foi adicionada aos poços superiores da câmara, separados por um filtro de nitrocelulose 8.0 µm (Millipore, USA) do fator quimiotático (LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) presente no compartimento inferior. A migração leucocitária foi mensurada pela distância, medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro em relação ao plano inferior que continha duas células, em dez campos microscópicos. Indometacina, um anti-inflamatório não esteroide (AINE) inibidor da síntese de prostaglandinas, foi utilizada como controle positivo.

### 3.6. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica do óleo de *A. spinescens* foi avaliada frente a isolados depositados na Micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os testes foram realizados com as espécies *Candida albicans* (ATCC18804, CA01), *C. krusei* (ATCC6258, CK02), *C. tropicalis* (CT56, CT72A), *C. parapsilosis* (RL01, RL20), *C. glabrata* (CG40039, RL24) e os fungos filamentosos *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*. Para obtenção de células viáveis utilizadas nos experimentos, as espécies de *candida* foram crescidas em ágar saboraud com cloranfenicol por 24 h à 35 °C e as espécies de fungos filamentosos 5 dias a 32°C.

Para as espécies de *Candida* a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M27-A3 padronizado pelo

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008). Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo l-glutamina, sem bicarbonato de sódio – tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS) e a amostra testada na faixa de concentração que variou entre 2 a 512 µg/mL. A CIM foi definida como a menor concentração da substância na qual o microrganismo testado não demonstrava crescimento visível. Os experimentos foram realizados em triplicata e fluconazol foi utilizado como controle positivo do teste. Como os testes foram realizados em meio aquoso (RPMI), as amostras foram solubilizadas com Tween 20 e realizou-se um controle negativo com essa substância, para verificar se a mesma não inibe o crescimento fúngico. Para os fungos filamentosos foi realizado um *screening* na concentração de 256 µg/mL.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Considerando os estudos realizados até o momento, neste trabalho foi avaliada a composição química do óleo das sementes de *Acanthosyris spinescens* e seu potencial antiquimiotáxico e antifúngico.

### **4.1. Extração**

#### **4.1.1. Extração I**

Na extração do óleo, após a evaporação do solvente, o aspecto do conteúdo do béquer A era leitoso, enquanto o do béquer B era amarelado e menos leitoso. Os rendimentos foram calculados conforme apresentado na Tabela 1. Os béqueres foram pesados novamente para o cálculo do rendimento (Tabela 1) e o conteúdo foi transferido para tubo de ensaio tarado, para que fosse visível a separação do óleo do conteúdo leitoso.

Tabela 1: Rendimento da extração I.

	<b>Peso do béquer (g)</b>	<b>Peso do béquer + amostra (g)</b>	<b>Peso da amostra (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Béquer A</b>	52,3411	53,2125	0,8714	34,93
<b>Béquer B</b>	47,2889	47,6531	0,3642	19,65

#### 4.1.2. Extração II

Calculou-se o rendimento da segunda extração, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento da extração II.

	<b>Béquer (g)</b>	<b>Béquer + amostra (g)</b>	<b>Óleo (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Amostra A</b>	18,7200	18,8973	0,1773	7,21
<b>Amostra B</b>	31,1159	31,2479	0,1320	6,39

O rendimento da extração II foi mais baixo que o da extração I, provavelmente porque na primeira extração foram realizadas três lavagens com hexano da amostra triturada, na segunda extração foi feita apenas uma lavagem.

#### 4.2. Análise por Cromatografia a Gás

O cromatograma da amostra A da extração I não apresentou boa resolução, o que foi atribuído à presença do óleo branco turvo, que não estava presente na amostra B, cujo cromatograma apresentou boa resolução. Para certificar-se que o resultado ficaria bom, foi realizada a extração II e a técnica foi repetida.



A análise do CG da extração II apresentou bom resultado, conforme a Figura 1, e verificou-se que os cromatogramas das amostras são iguais, então se conclui que poderia juntar os dois grupos de amêndoas para as próximas análises e identificar os componentes dos óleos.

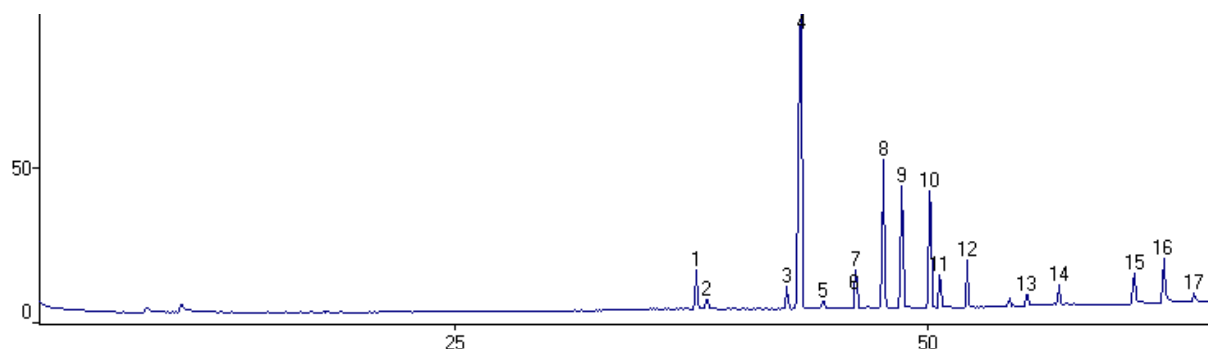


Figura 1: Cromatograma obtido por CG-EM do óleo fixo de *Acanthosyris spinescens* após derivatização.

Na análise química do óleo observou-se a presença de 17 compostos, sendo dois com possíveis ligações triplas. segundo os espectros fornecidos pela biblioteca do equipamento, os compostos observados e a porcentagem estão referenciados na Tabela 3.

Tabela 3: Compostos observados no óleo de *Acanthosyris spinescens* e suas porcentagens.

Pico	Tempo de retenção	Nome do composto	%
1	37,764	Ácido Cis-10-pentadecenoico	3,50
2	38,317	Não identificado	0,58
3	42,552	Ácido estearico	1,62
4	43,292	Ácido oleico	43,36
5	44,496	Não identificado	0,43
6	46,111	Não identificado	1,32
7	46,217	Não identificado	2,63

Pico	Tempo de retenção	Nome do composto	%
8	47,675	ácido cis- 11-eicosanoico	13,16
9	48,642	Ligação tripla	10,11
10	50,123	Não identificado	9,58
11	50,641	Ligação tripla	2,22
12	52,094	Ácido Araquidônico	3,20
13	55,258	Não identificado	0,83
14	56,950	Não identificado	1,32
15	60,924	Não identificado	2,41
16	62,459	Não identificado	3,43
17	64,073	Não identificado	0,30

Sete ácidos graxos já haviam sido identificados no óleo de *A. spinescens* (Badami e Patil, 1980), são eles o ácido estearóico (5%), o santálbico (1%), pirúlico (9%), 17-octadecen-9-inoico (18%), 11,17-octadecadien-9-inoico (4%), 8-hidroxi-octadeca-11,17-dien-9-inoico (4%) e 10,16-heptadeca-9-inoico (10%). Desses, a biblioteca do equipamento identificou apenas o ácido pirúlico, constituindo 10,11% do total do óleo, como mostra o pico 9 na Tabela 3. A biblioteca também identificou que havia dois compostos com ligações triplas, sendo um deles o ácido pirúlico.

Normalmente os óleos de sementes contêm traços de cadeias lineares e ácidos graxos com número ímpar de carbonos. O óleo de *A. spinescens* é considerado não usual por apresentar mais de 10% de ácidos graxos com número ímpar de carbonos (Litchfield, 1967) (Tabela 3) e uma alta concentração de ácidos graxos com cadeia normal de C<sub>17</sub> (Powell e Smith Jr., 1966). No óleo da semente de outra espécie da família Santalaceae, a *Jodina rhombifolia*, também foi observada a presença de ácidos graxos não usuais, mas compondo 55% do total do óleo desta planta (Spitzer *et al.*, 1994).

Os compostos majoritários no óleo de *A. spinescens* são os dos picos 4 (ácido oleico – 43,36%), do pico 8 (ácido cis- 11-eicosanoico - 13,16%) e do pico 9 (10,11%), um composto com ligação tripla, provavelmente o ácido 10-heptadecen-8-inoico (ácido pirúlico). Além do pico 9, no pico 11 também aparece uma possível ligação tripla, mas a substância não foi identificada. Em 1966 haviam sido identificados os ácidos 17-octadecen-9-inoico, trans-10,16-heptadecadien-8-inoico e trans-11,17-octadecadien-9-inoico no óleo desta espécie (Powell e Smith Jr., 1966), além de outros compostos não familiares, no entanto não foi confirmada a presença de nenhum destes ácidos nesta análise.

As substâncias foram identificadas pelo espectro de massas fornecido pelo equipamento, conforme a figura 2, em que a NIST dá a opção que o pico 1 é o ácido cis-10-pentadecenoico (ácido palmítico), que representa 3,5% do total do óleo. Já para o pico 2 a NIST não reconhece a substância pelo espectro de massas, que está representado na Figura 3. O pico 12 (Figura 4) provavelmente é o ácido araquidônico segundo consulta a NIST, mas não se tem certeza sobre essa substância.

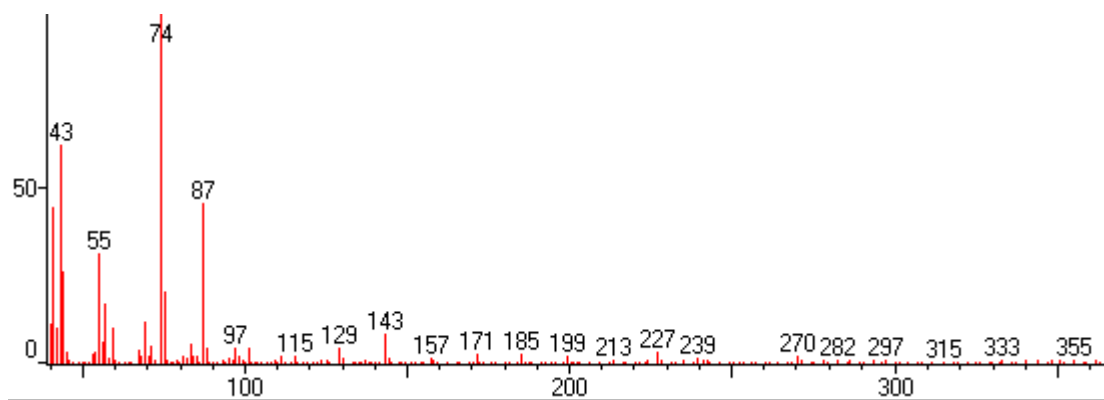


Figura 2: Ácido palmítico, conforme opção da NIST.

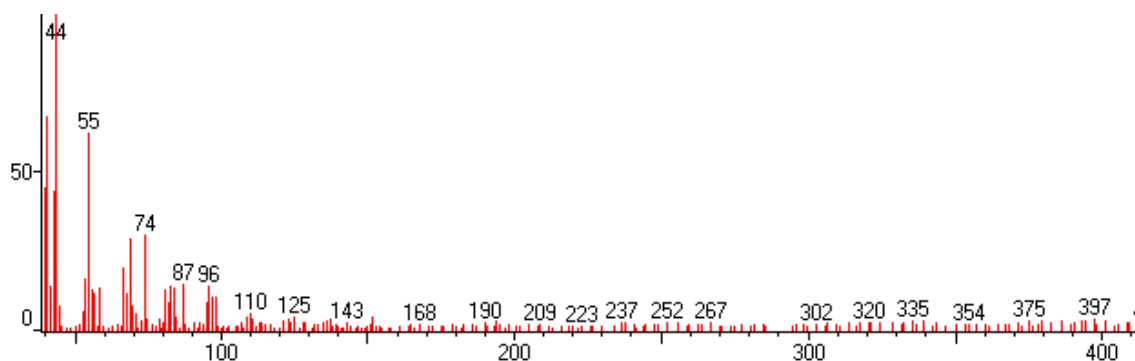


Figura 3: A NIST não apresentou opções de que substância está representada pelo espectro.

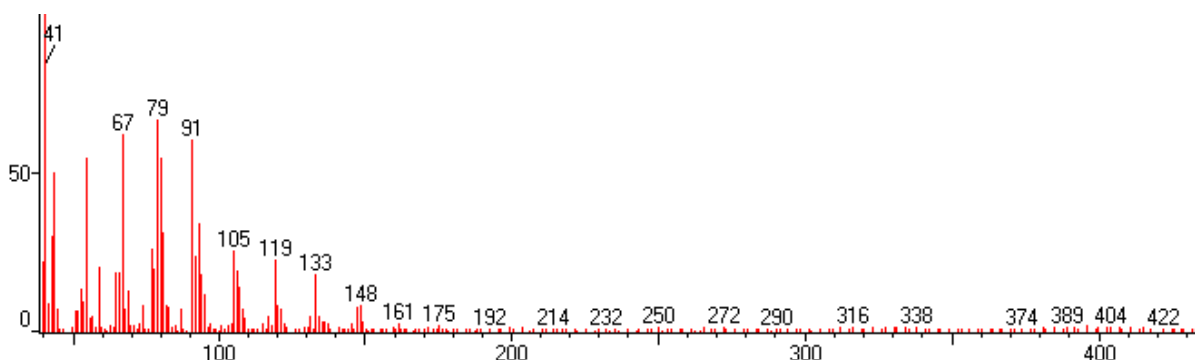


Figura 4: Provavelmente o ácido araquidônico.

Nas Figuras 5 e 6 estão apresentados os espectros de massas dos picos 9 e 11, respectivamente, em que provavelmente há ligação tripla. No pico 9 está representado o espectro de massas do ácido 10-heptadecen-8-inoico (ácido pirúlico), um ácido com 17 carbonos, uma ligação tripla e uma dupla, representado na Figura 7. No pico 11 a NIST sugere que seja o 4-hexadecen-6-ino ou o ácido 11,14,17-eicosatrienoico, mas não há como precisar. Esses ácidos graxos acetilênicos que contêm sistemas ene-ino conjugados foram encontrados em membros das famílias Santalaceae e Olacaceae (Powell e Smith Jr., 1966), sendo que a última apresentou uma preponderância a ácidos graxos com dois grupos acetilênicos (Spitzer *et al.*, 1994). Alguns ácidos acetilênicos com estruturas semelhantes aos ácidos graxos acetilênicos foram encontrados em esponjas marinhas (*Suberites mammularis* e *Suberites japonicus*) e apresentaram atividade citotóxica, antifúngica e antimicrobiana (Hwang *et al.*, 2013).

O ácido pirúlico é um ácido graxo acetilênico ene-ine (Spitzer *et al.*, 1997) que apresenta fórmula molecular  $C_{17}H_{28}O_2$ , peso molecular 264,40302 g/mol e já foi descrito em outras espécies da família Santalaceae, como *Jodina rhombifolia* (Spitzer *et al.*, 1994). A presença desse ácido já foi descrita no óleo da semente de *A. spinescens*, mas não há relatos de estudos sobre o mesmo.

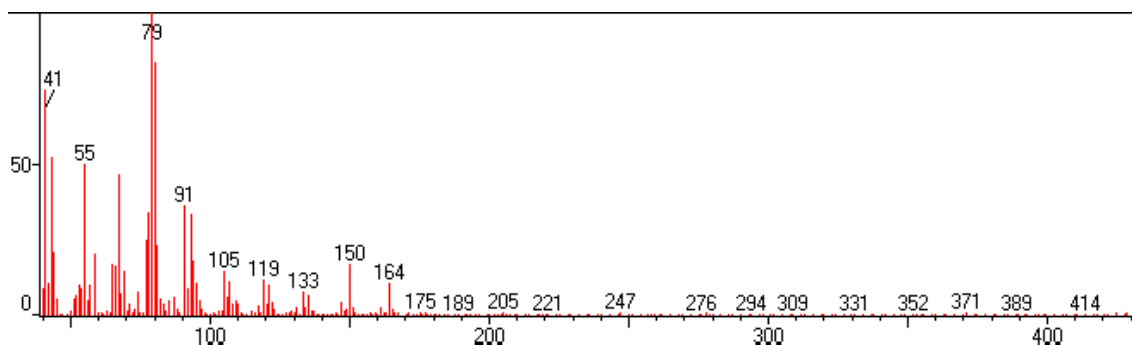


Figura 5: Ácido 10-heptadecen-8-inoico, conforme opção da NIST.

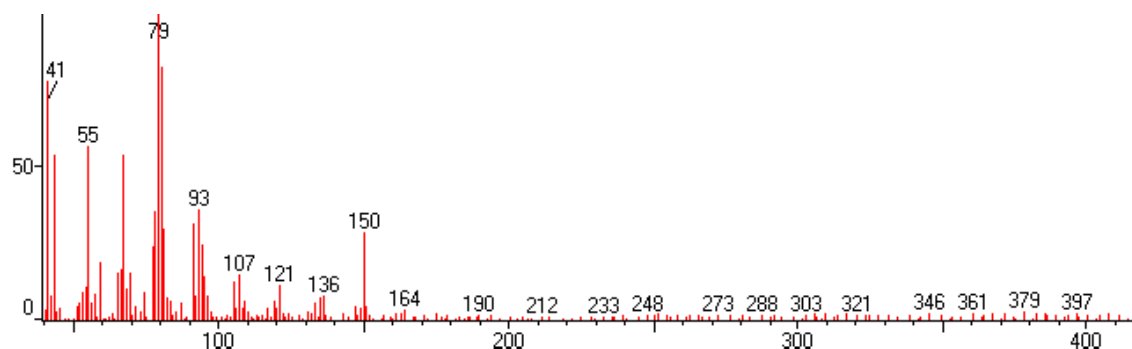


Figura 6: A NIST não informa que substância está representada pelo espectro, apenas que há ligação tripla.

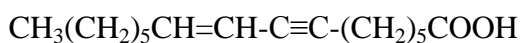
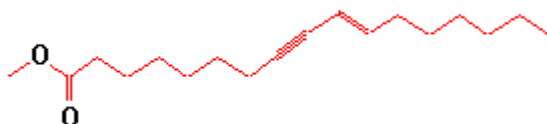


Figura 7: Representações do ácido 10-heptadecen-8-inoico.

### 4.3. Atividade antiquimiotóxica

Para o cálculo da inibição, considera-se que o controle inibe 100% da migração leucocitária, então a média do controle (75,17  $\mu\text{m}$ ) é considerada como inibição total para comparação com as amostras. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Migração ( $\mu\text{m}$ ) de neutrófilos tratados com o óleo de *A. spinescens* e controle negativo, observado pelo método da Câmara de Boyden modificado.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Controle	10	1	0,1	0,01	0,001
	86	50	86	64	66	44
	66	59	70	68	44	40
	70	54	58	52	40	50
	60	60	86	50	38	60
	88	68	62	56	52	66
	66	68	58	68	40	78
	64	68	68	52	48	64
	74	60	80	64	50	66
	80	60	60	72	48	60
	70	64	66		60	60
	90	54				
	88					
Média	75,17	60,45	69,40	60,67	48,60	58,80
Desvio padrão	10,74	6,15	10,96	9,00	9,00	11,32

Na Figura 8 está representado o percentual de migração leucocitária relativo a cada amostra e na Figura 9 o percentual de inibição da migração. Observa-se que para a amostra na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  a média da migração foi de 60,45  $\mu\text{m}$ , logo a taxa de inibição foi 19,58%. A amostra na concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  foi a que apresentou menor média de migração leucocitária (48,60  $\mu\text{m}$ ), consequentemente apresentou maior inibição da migração, que foi 35,34%, então apresentou-se como a concentração com maior efeito antiquimiotático, seguida pela concentração de 0,001  $\mu\text{g/mL}$ , cuja inibição foi de 21,78%. A concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  foi a que apresentou menor inibição (7,68%).

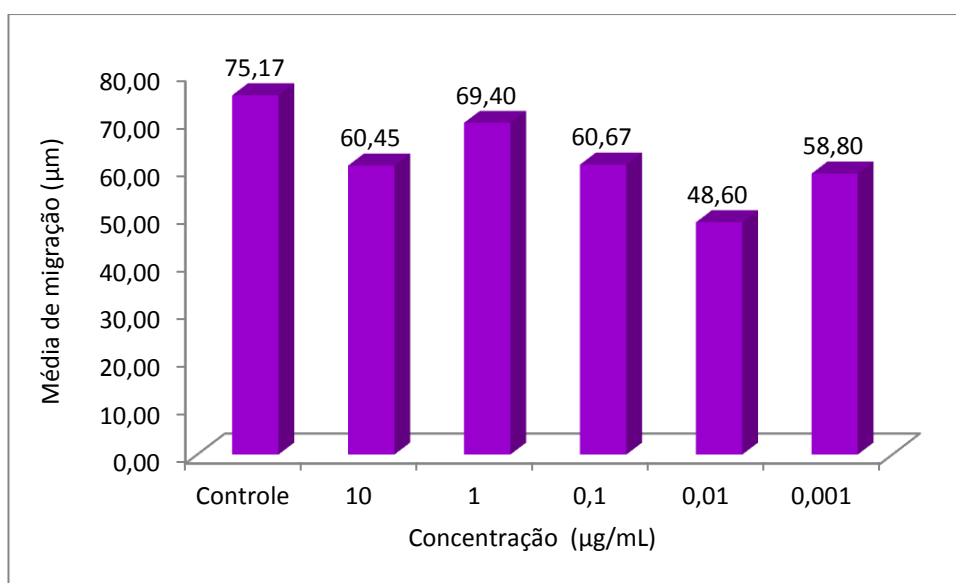


Figura 8: Migração ( $\mu\text{m}$ ) de neutrófilos tratados com o óleo de *A. spinescens* e controle negativo.

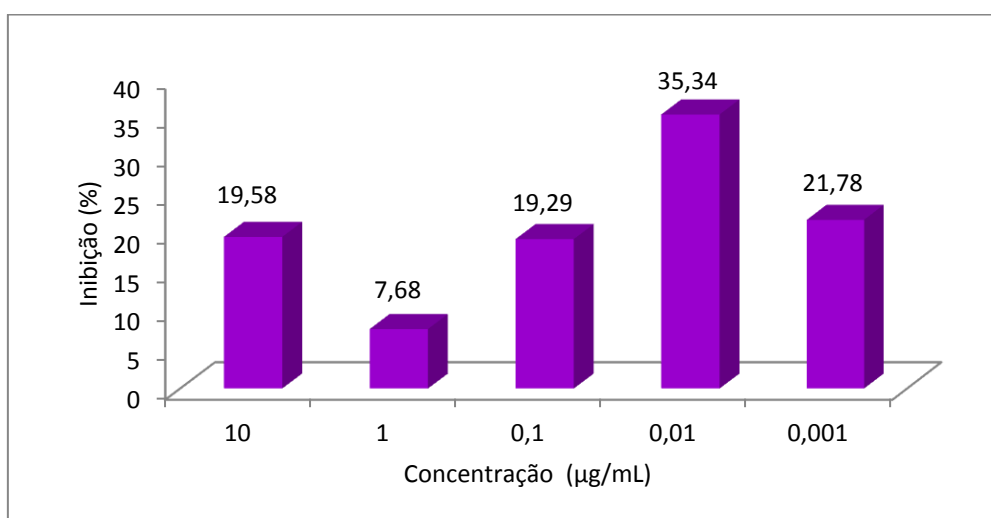


Figura 9: Resultado da inibição da migração leucocitária.

Estudos demonstraram que o ácido ximênico isolado inibe a biossíntese de tromboxanos B2 e pode ser um potente inibidor de leucotrienos B4, além de afetar a bioconversão do ácido arquidônico em prostaglandinas, inibindo a atividade da COX (Hettiarachchi *et al.*, 2010). Portanto, pode ser o ácido santálbico o responsável pela atividade anti-inflamatória das plantas da família Santalaceae, porque a presença desse ácido não foi identificada no óleo da semente de *A. spinescens*, que apresentou baixa atividade. As atividades demonstradas para as esponjas marinhas foram atribuídas aos átomos de iodo presentes nas moléculas (Hwang *et al.*, 2013) e não às ligações triplas dos ácidos graxos.

#### 4.4. Atividade antifúngica

Conforme a Tabela 5 a CIM para todas as amostras foi maior que 512 µg/mL, portanto não havendo inibição do crescimento fúngico em nenhuma das concentrações do óleo de *A. spinescens* testadas.

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de *A. spinescens*, fluconazol e tween 20 frente a isolados de *candida*.

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
<i>Fungos leveduriformes</i>		Óleo	Fluconazol	Tween 20
<i>Candida albicans</i>	ATCC18804	> 512	4	> 512
	CA01	> 512	1	> 512
<i>Candida tropicalis</i>	CT72A	> 512	4	> 512
	CT56	> 512	4	> 512
<i>Candida krusei</i>	ATCC6258	> 512	NT	> 512
	CK02	> 512	NT	> 512
<i>Candida glabrata</i>	CG40039	> 512	32	> 512
	RL24	> 512	32	> 512
<i>Candida parapsilosis</i>	RL01	> 512	-	> 512
	RL20	> 512	1	> 512

NT: não testado.

(-) não houve crescimento fúngico.



Conforme já havia sido demonstrado por Xing-Cong *et al.*, (2008), os ácidos graxos podem não ser tão efetivos como os antifúngicos sintéticos. Como é observado na Tabela 5, o fluconazol inibiu o crescimento fúngico para todas as espécies, exceto para *Candida krusei*, que não foi testada, pois ela é intrinsecamente resistente ao fluconazol. Nos poços em que o Tween 20 foi utilizado como controle percebe-se que não houve inibição, o CIM foi maior que 512, então o tween não está interferindo no teste.

Além de *Candida* spp., também realizou-se um *screening* com espécies de fungos filamentosos, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*. No teste observou-se crescimento de todas as espécies avaliadas na presença do óleo na concentração de 256 µg/mL. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo de *A. spinescens* também não apresenta inibição de crescimento de fungos filamentosos.

Assim como na atividade anti-inflamatória, o óleo de *A. spinescens* não inibiu o crescimento dos fungos nas concentrações testadas. Como o ácido ximênico não está presente no óleo desta planta, há perspectiva que o seja o responsável pela atividade antifúngica, pois já foi comprovado que esse ácido atua contra fungos patogênicos (Hettiarachchi *et al.*, 2010) e está presente em outras plantas da família Santalaceae (Okada *et al.*, 2013).

## 5. CONCLUSÕES

Com o crescente interesse da indústria farmacêutica em produzir medicamentos a partir de matéria prima vegetal aliado aos princípios da farmacognosia, desenvolveu-se esse trabalho com *Acanthosyris spinescens*, uma planta pertencente à família Santalaceae. Foi analisada a composição do seu óleo, assim como a atividade anti-inflamatória e antifúngica, atividades já descritas para outras espécies dessa família.

A elucidação dos componentes do óleo da semente de *Acanthosyris spinescens* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi efetiva e foi possível identificar alguns dos seus compostos, a proporção de cada um e a presença de ácidos graxos não usuais com ligações triplas. Foram identificados dois ácidos graxos acetilênicos com ligações triplas, sendo um deles o ácido pirúlico, já descrito em outros estudos e um dos componentes majoritários do óleo da semente.

Com relação a atividade antiquimiotóxica, a concentração que apresentou melhor resultado (35,34%) foi a de 0,01 µg/mL, que é considerado um resultado baixo, então não é viável para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica.

Para a atividade antifúngica o óleo não foi efetivo, porque não inibiu o crescimento de nenhum dos fungos testados em nenhuma concentração. Pode-se atribuir os resultados encontrados em outros estudos para essas atividades a outros componentes do óleo das sementes de espécies da família Santalaceae, que não estejam presentes em *A. spinescens*.

Para as atividades testadas, o óleo de *A. spinescens* não apresentou resultado positivo. Ainda assim, tendo em vista que seu componente majoritário é o ácido oleico, que apresenta poder cicatrizante, o mesmo poderia ser investigado visando a obtenção de uma formulação

de uso tópico, no futuro, como uma nanoemulsão, em que o princípio ativo seria o próprio núcleo oleoso.

## REFERÊNCIAS

- AITZETMÜLLER, K. Santalbic acid in the plant kingdom. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 9, p. 1609-1617, 2012.
- BADAMI, R.C.; PATIL, K.B. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 3, p. 119-153, 1980.
- BUTLER, A.; KEATING, R. Old herbal remedies and modern combination therapy. **Scottish Medical Journal**, v. 56, p. 170-173, 2011.
- DOSTÁLEK, T.; MÜNZBERGOVÁ, Z. Habitat requirements and host selectivity of *Thesium* species (Santalaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 164, n. 4, p. 394-408, 2010.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Brasília : Anvisa, 2010, 2v.
- GUIPU, L.; SINGH, A.; LIU, Y.; SUNDERLAND, B.; LI, D. Comparative effects of Sandalwood Seed Oil on fatty acid profiles and inflammatory factors in rats. **Lipids**, v. 48, n. 2, p. 105-113, 2013.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.
- HETTIARACHCHI, D.; LIU, Y.; FOX, J.; SUNDERLAND, B. Western Australian sandalwood seed oil: new opportunities. **Lipid Technology**, v. 22, n. 2, p. 27-29, 2010.
- HOPKINS, C.Y.; CHISHOLM, M.J., A Survey of the conjugated fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 45, n. 3, p. 176-182, 1968.
- HOU, X.; SUN, M.; GAO, H.; CUI, Y.; XIAO, K. Chemical constituents from the stems of *Dendrotrophe frutescens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 156–159, 2013.
- HWANG, B.; LEE, K.; YANG, C.; JEONG, E.; RHO, J. R. Characterization and anti-inflammatory effects of iodinated acetylenic acids isolated from Marine Sponges *Suberites mammilaris* and *Suberites japonicus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2355-2359, 2013.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil:** guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 768p. il.

LITCHFIELD, C.; HARLOW, R.D.; REISER, R. Gas-liquid chromatography of triglyceride mixtures containing both odd and even carbon number fatty acids. **Lipids**, v. 2, n. 5, p. 363-370, 1967.

MAROYI, A. *Ximenia caffra* Sond. (Ximeniaceae) in sub-Saharan Africa: a synthesis and review of its medicinal potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 81–100, 2016.

MEZAYEN, R.E; GAZZAR, M.E.; NICOLLS, M.; NOMIYAMA, H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. **Immunology Letters**, v. 106, n. 1, p. 72-81, 2006.

MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; GARCIA-GIMENEZ, M.D.; ÁNGEL-MARTÍN, M.; PEREZ-CAMINO, M.C.; FERNANDEZ ARCHE, A. Long-chain fatty alcohols from evening primrose oil inhibit the inflammatory response in murine peritoneal macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, n.1, p. 131-136, 2014.

NICKRENT, D.L.; FRANCHINA, C.R. Phylogenetic relationships of the Santalales and relatives. **Journal of Molecular Evolution**, v. 31, n. 4, p. 294-301, 1990.

OKADA, S.; ZHOU, X.R.; DAMCEVSKI, K.; GIBB, N.; WOOD, C.; HAMBERG, M.; HARITOS, V.S. Diversity of 12 fatty acid desaturases in Santalaceae and their role in production of seed oil acetylenic fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32405-32413, 2013.

PIORNEDO, R.R. **ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* EM CAMUNDONGOS.** Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba: UFPR, 2010.

POWELL, R.G.; SMITH JR., C.R. New acetylenic fatty acids from *Acanthosyris spinescens* seed oil. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 625-631, 1966.

RAJ, J. B. Morphological and embryological studies in the Family Santalaceae—XIII *Choretrum lateriflorum* R. Br. **Österreichische Botanische Zeitschrift**, v. 120, n. 1/2, p. 143-154, 1972.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

SALGADO, A.P.S.P.; SCHMIDT, P.A.; FRAGA, A.C.; CASTRO, D.P.; SILVA, V.F.; VILELA, F.J.; AGUIAR, P.M.; CASTRO NETO, P. Rendimento de óleos fixos de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) e sua caracterização química. In: **Congresso Brasileiro do Algodão**, 2007. Disponível em: <[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba4/index.html](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/index.html)>. Acesso em 15 out. 2016.

SPITZER, V.; TOMBERG, W.; HARTMANN, R.; AICHHOLZ, R. Analysis of the seed oil of *Heisteria silvanii* (Olacaceae) a rich source of a novel C<sub>18</sub>acetylenic fatty acid. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1189-1200, 1997.

SPITZER, V.; BORDIGNON, S.A.; SCHENKEL, E.P.; MARX, F. Identification of nine acetylenic fatty acids, 9-hydroxystearic acid and 9,10-epoxystearic acid in the seed oil of *Jodina rhombifolia* hook et arn. (Santalaceae). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, n.12, p. 1343-1348, 1994.

SUYENAGA, E.S.; KONRATH, E.L.; DRESCH, R.R.; APEL, M.A.; ZUANAZZI, J.A.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, n. 7, p. 698-704, 2011.

THIBANE, V. S.; ELLS, R.; HUGO, A.; ALBERTYN, J.; RENSBURG, W. J. J.; WYK, P. W. J.; KOCK, J. L. F.; POHL, C. H. Polyunsaturated fatty acids cause apoptosis in *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1463–1468, 2012.

XING-CONG, L.; JACOB, M.R.; KHAN, S.I.; ASHFAQ, M.K.; BABU, K. S.; AGARWAL, A. K.; ELSOHLI, H. N.; MANLY, S.P.; CLARK, A.M. Potent *in vitro* antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2442–2448, 2008.

XU, T.; TRIPATHI, S.K.; FENG, Q.; LORENZ, M.C.; WRIGHT, M.A.; JACOB, M.R.; MASK, M.M.; BASERSON, S. R.; LI, X. C.; CLARK, A.M.; AGARWAL, A.K. A potent plant-derived antifungal acetylenic acid mediates its activity by interfering with fatty acid homeostasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n.6, p. 2894–2907, 2012.

